

17. 動物管理室

室長 山田靖子

概要

「動物の愛護及び管理に関する法律（動愛法）」は5年に一度見直しが行われることになっており、平成24年9月5日に改正された。改正前には動物実験施設の届出制が議論されたが、今回の見直しでは実験動物に関する記載は改正されなかった。感染研においては機関による自主管理をますます推進していくこととする。

村山庁舎動物実験施設はヒューマンサイエンス振興財団による動物実験実施施設の認定調査を平成24年8月27日に受け、同9月28日に認定された。戸山庁舎の動物実験施設はすでに平成23年に同財団から認定の更新を受けている。

昨年度に引き続き、実験動物に関する研究を行なった。実験動物の感染症に関する研究では、以前より行なっているマウス肝炎ウイルス、マウスノロウイルス、*Corynebacterium ulcerans*の研究を進めた。モデル動物の開発研究として、麻疹ウイルス病態モデルとしてのカンクイザル、人獣共通感染症の研究として、リフトバレー熱ウイルス、ヒトバベシア症の研究を行った。

動物管理室は海外および国内から動物実験施設見学や動物実験管理運営の研修に対応している。平成24年度は東京大学獣医学科学生実習、JICA「ワクチン品質管理技術コース」研修であった。

厚生労働省が所管する国立研究機関（独立行政法人を含む）の動物実験施設では、横の連携を取り合う協議会（名称：厚生労働省関係研究機関動物実験施設協議会）を設立しており、平成24年度は動物実験に関わる国内情勢の報告会を感染研で開催した。また、国内では現在、動物実験施設の第3者評価が3つの異なる団体で実施されているが、動物管理室長はそのうち2つの第3者評価システムに協力している。その他、実験動物学会の常務理事、微生物モニタリングに関する委員会委員などを担っている。

村山庁舎では今まで1研究室の中を実験室と居室部分に区切って使用していたが、独立した居室が配分され

たので、今後は研究活動がさらに活発になることが期待される。

平成24年度には、動物管理区内で動物に使用した注射針を誤って指に刺した事故、カンクイザルによる咬傷がそれぞれ1件発生した。

平成24年4月から土田耕三が再任用職員として当室所属となった。平成25年1月から平井明香主任研究管が米国ノースカロライナ大学へ留学し、研究休職となった。平成25年1月、永年に渡り飼育業務に従事してきた小川敏雄が辞職した。

講習会開催及び動物管理区の利用状況

動物管理室は動物実験委員会の事務局を担当し、動物実験講習会を開催している。講習会では、実験動物及び動物実験に関する法規制、機関内規程、また動物実験の3Rsを実践するための基本的な事項を受講者に解説する。講習会の会場では実技の研修を実施できないため、新規に動物実験を行う従事者に対して、国内の団体が作成した動物取扱および投与方法のビデオで実技の基本を学ぶ機会を提供している。平成24年8月のHS財団による認定調査時のコメントに対応して、機関内規程及び動物実験委員会の見解を改正したので、改正点を周知するため、平成24年12月末から平成25年1月にかけて継続従事者を対象にした講習会を行った。この改正後に講習会を受講した人数は継続及び新規を合わせて平成25年3月31日までに406名であった。平成24年度に申請された動物実験計画は390件であった。

動物実験委員会の講習会とは別途に、各庁舎ではそれぞれの動物実験施設の利用方法および実験動物の飼養・保管に関する講習会を行い、受講者を施設利用者として登録している。各施設の利用登録者数は平成25年3月31日現在、戸山庁舎226人、村山庁舎247人、ハンセン病研究センター19人である。感染研の3庁舎で飼養保管している動物の合計は平成25年3月31日現在、マウス7,215匹、ラット38匹、モルモット183匹、ウサギ40羽、ハムスター12

匹、スナネズミ 16 匹、コットンラット 1 匹、フェレット 24 匹、ネコ 9 匹、霊長類 108 匹、ニワトリ 13 羽である。

施設利用及び動物実験講習会 受講実績

開催 月日	開催 場所	受講者数			
		施設利用 (戸山)	施設利用 (村山)	施設利用 (ハン セン)	動物 実験 (全所)
4月11日	戸山	26			29
4月19日	ハンセン			1	
4月24日	村山		1		
5月8日	村山		2		
6月5日	戸山	6			9
7月31日	村山		7		
7月31日	戸山				7
8月1日	戸山	3			
8月1日	村山		2		
8月24日	ハンセン			1	
10月3日	戸山	6			9
10月22日	戸山	1			1
12月5日	戸山	6			8
12月27日	戸山				298
1月9日	村山				82
2月6日	戸山	4			17
2月15日	戸山				1
合計		52 新規	12 新規	2 新規 なし	406 改正後 受講者

(太線は規程改正，斜字は外国人対照講習会)

業績

調査・研究

I 動物実験施設の管理

I-1 微生物モニタリング定期検査

戸山、村山両庁舎の各飼育室にモニター動物を配置し、月一回定期的に微生物モニタリングを行っている。戸山庁舎ではウサギの飼育がなかったため、平成 24 年度はウサギの微生物モニタリングを行なわなかった。モニタリング結果は別表 1 に示す。緑膿菌、黄色ブドウ球菌に陽性が散見されたが、これらはいわゆる日和見病原体で免疫機能が正常な動物には病原性はない。それ以外の病原体について

は全て陰性であり、飼育室は清浄に保たれている。

(網 康至、滝本一広、新倉 綾、田原口元子、平井明香、小川敏雄、須崎百合子、山田靖子)

I-2 胚操作業務

感染研の動物実験施設では遺伝子改変マウスおよび突然変異マウス等の特殊な系統マウスの系統維持・繁殖が増加傾向にある。そこで、繁殖による飼育スペース、維持費の削減および不必要に系統維持繁殖を継続することを避けることを目的として、精子および受精卵の凍結保存を実施可能な体制を整えた。利用者の依頼に応じて精子の凍結保存業務から開始し、受精卵の凍結保存業務の開始に向けて技術の習得を行った。

(田原口元子、山田靖子)

II 実験動物の感染症に関する研究

II-1 マウス肝炎ウイルス(MHV)受容体に関する研究

MHV 高感受性 C57BL/6(B6)マウスのウイルス受容体 CEACAM1a のウイルス結合部位を低感受性 SJL マウスの CEACAM1b のものと置換した CEACAM1ba を発現する B6 マウス(B61ba)は、MHV-A59 に感染しない。そこで B61ba マウスの MHV 抵抗性機構を解析している。CEACAM1ba と CEACAM1b を株化細胞や SJL マウス胎児繊維芽細胞(MEF)にそれぞれ発現させると両者は同程度の受容体活性を示すが、B61ba マウスの MEF では CEACAM1ba の受容体活性は CEACAM1b より著しく低いことから、B6 マウスに CEACAM1ba の受容体活性を阻害する因子が存在する可能性が示唆された。

[平井明香、田口文広¹、山田靖子 (1日本獣医生命科学大学)]

II-2 マウス肝炎ウイルスの病原性に関する研究

マウス肝炎ウイルスの親株 MHV2 とその変異株 MHV-2f をマウスに接種し感染実験を行った結果では、MHV2 感染マウスでは高い致死率を示したのに対し、MHV-2f 感染マウスでは全て生存し病原性の著しい相違を示していた。そこで MHV2 と MHV-2f の病原性の相違を詳細に解明するため、経時的に採取した感染マウスの肝臓、脳および大腸のウイルス増殖を検討した。これらの臓器において MHV2 の方が MHV-2f よりウイルス価(PFU)が 10³ から 10⁵ 以上も高く MHV2 接種マウス体内で顕著な増殖を示していることが分かった。特に MHV2 接種マウスの肝臓と脳内においては、接種後 2 日でウイルス価が

急激に上昇し、その後も高い値を示し続けたことにより死に至ったと考えられた。

(田原口元子、新倉綾、山田靖子)

II-3 有機物存在下におけるマウスノロウイルス (MNV) に対する弱酸性次亜塩素酸水の消毒効果

ウイルス液 50 μ l にマウス糞便乳剤 50 μ l を有機物として加え、900 μ l の弱酸性次亜塩素酸水 (pH6.0, 残留塩素 60ppm) を混和し、一定時間後のウイルス力価を測定することにより、その消毒効果を検討した。弱酸性次亜塩素酸水は有機物存在下でも MNV に対し次亜塩素酸 Na 溶液 (残留塩素 70~100ppm) とほぼ同等の不活化効果を示した。また、有機物存在下でも、反応時間を長くすることでウイルス力価を 10⁵ 以上低下することができた。

(滝本一広、山田靖子)

II-4 塩素系消毒薬の MNV 感染防御効果について

MNV に対して *in vitro* で消毒効果の認められた塩素系消毒薬により、マウスへの MNV 感染を防御できるかを検討した。マウスに弱酸性次亜塩素酸水または次亜塩素酸 Na 溶液 (残留塩素 10ppm) を飲水として 2 または 4 週間与えた後、MNV 感染マウスを同居させた。糞便への MNV 排出および腸管の MNV 感染をブラックアッセイおよび RT-PCR にて調べたところ、同居 1 週目で全マウスの糞便中に MNV の排出が確認され、同居 4 週目の盲腸のウイルス力価もコントロールと差はなく、感染防御効果は認められなかった。

(滝本一広、山田靖子)

II-5 Tyzzer 菌 (*Clostridium piliforme*) の鞭毛蛋白を抗原として用いた ELISA について

H4IIE 細胞で増殖した Tyzzer 菌 (RT 株) を回収し、遠心分離により鞭毛を単離した。単離した分画について SDS-PAGE での分子量から鞭毛であることを確認した。この鞭毛分画を抗原として ELISA を行ったところ、Tyzzer 菌陽性血清と強い反応を示し、鞭毛が ELISA 抗原として使用できることが示唆された。

(滝本一広)

II-5 サル由来 *Corynebacterium ulcerans* の性状解析

国内の繁殖施設から導入した実験用カニクイザルから分離されたジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* の薬剤感受性を調べた。*C. ulcerans* 感染患者ではクリンダマイシンおよびエリスロマイシン耐性株が報告されている。サル由来株はクリンダマイシンに中間(intermediate)であったが、

エリスロマイシンを含め広範囲の薬剤に感受性を示した。抗生剤投与により実験用カニクイザルから *C. ulcerans* を排除できる可能性があるが、一方 *C. ulcerans* 感染イヌでは抗生剤投与による菌の排除が困難であったと報告されていることや薬剤耐性菌の出現を誘導する可能性があることから、実験用サルから本菌を排除する効果的な方法を確立することが今後の課題である。

[平井明香、小宮貴子¹、須崎百合子、網康至、山本明彦¹、山田靖子 (1細菌2部)]

III モデル動物の開発

III-1 麻疹ウイルス感染症モデル動物の開発と病態解析

脳内における麻疹ウイルス持続感染カニクイザルの中枢神経を病理組織学的に解析したところ、感染細胞接種部位である視床に、軽度のグリア細胞の増生が認められたが、いずれの部位においても免疫組織学的に麻疹ウイルス抗原は認められなかった。これは、持続感染中のウイルス遺伝子の翻訳がきわめて低いことを示唆し、分離ウイルスの培養細胞での挙動に一致する。

(網 康至、須崎百合子)

IV 人獣共通感染症に関する研究

IV-1 リフトバレー熱ウイルス L 蛋白に関する研究

リフトバレー熱ウイルス (ブニヤウイルス属) は反芻動物とヒトが感染し、蚊が媒介する人獣共通感染症である。RVFV の RNA ポリメラーゼである L 蛋白質には N 末端領域にロイシンジッパー様のモチーフ (LZIP) が存在し、本研究では、その生物学的機能を調べている。今年度は LZIP と相互作用する因子の探索を行い、MC-LS(LCQ) によるペプチド解析と MASCOT によるホモロジーサーチ等により DDX3X、Myosin-Ic AP-2 α が L と特異的に結合していることを示唆する結果が得られた。さらに、BIFC (Bimolecular Fluorescence Complement) アッセイによって ZIP が L の内部 (特に C 末端領域) とも相互作用することが明らかとなった。以上の結果から LZIP は細胞内因子や、L の N,C 末端領域を介した分子内会合に関与していることが強く示唆された。

[新倉綾、佐々木祐子¹、池上徹郎²、C.J.Peters²、牧野伸治²、山田靖子(1細菌2部、²テキサス大学医学部)]

IV-2 ヒトバベシア症に関する研究

Babesia divergens(*B.d*) によるヒトバベシア症は、ヨ

ヨーロッパを流行地とするマダニ媒介性の人獣共通感染症である。健常なヒトでは無症状であることが多いが、患者の 83%を占める脾臓摘出者では重篤になるリスクが高い。我々はこれまで、北海道のマダニ(*Ixodes persulcatus*)(以下 I.p)から日本で初めて B. d を検出し、遺伝的に欧州や米国と同じクラスターに属する原虫であることを明らかにしている。本研究では、自然宿主を探索する目的で、全国で捕獲されたシカから nestedPCR による B. d の検出を試みた。15 都道府県で捕獲されたシカ、合計 96 匹のうち、遺伝的にシカと I.p 由来のものは一致していた。本原虫による患者発生は報告されていないが、近年新型原虫によるヒトのバベシア症の発生報告が続いており、今後、この原虫について注意深く監視してゆく必要がある。

[新倉綾、今岡浩一¹、森川茂¹、山田靖子¹(¹獣医科学部)]

発表業績一覧

I 誌上発表

I-1 欧文発表

- 1) Yamamoto H, Suzuki J, Matsuda A, Ishida T, Ami Y, Suzaki Y, Adachi I, Wakita T, Takeda N, Li TC. Hepatitis E virus outbreak in monkey facility, Japan. *Emerg Infect Dis.* 18:2032-4. 2012
- 2) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 87:1105-14. 2013
- 3) Zamoto-Niikura A, Tsuji M, Qiang W, Nakao M, Hirata H, Ishihara C. Detection of two zoonotic *Babesia microti* lineages, the Hobetsu and U.S. lineages, in two sympatric tick species, *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus*, respectively, in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 78:3424-30. 2012
- 4) Hirai-Yuki A, Komiya T, Suzaki Y, Ami Y, Katsukawa C, Takahashi M, Yamamoto A and

Yamada YK. Isolation and characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from two closed colonies of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) in Japan. *Comparative medicine.* 63:1-7. 2013

I-2 邦文発表

- 1) 板垣伊織、山田靖子(2012): 実験動物感染症の現状—結核—。実験動物ニュース、61、64-66.

II 学会発表

II-1 国内学会

- 1) 山田靖子：マウス肝炎ウイルスの昔と今。シンポジウム「実験動物感染症の現状」。第 59 回日本実験動物学会総会、平成 24 年 5 月、別府。
- 2) 新倉綾、平田晴之、石原智明：我が国におけるシールツマダニからの *Babesia divergens* 様遺伝子の検出。第 154 回日本獣医学術集会、平成 24 年、9 月、大阪。